

声致相变纳米探针用于瘢痕疙瘩成纤维细胞级联疗法的实验研究

凡正超 夏纪筑 朱炜薇 胥莹 赵香芝

摘要 **目的** 制备一种新型脂质载药纳米探针 HD@P-NPs, 探讨其体外超声成像效果及用于瘢痕疙瘩成纤维细胞(KFs)迁移抑制和级联放大治疗的效果。**方法** 采用超声乳化法制备以全氟乙烷为核心脂质壳层, 负载血卟啉单甲醚和阿霉素的脂质载药纳米探针 HD@P-NPs, 观察其形态、结构并检测粒径和 Zeta 电位, 计算药物包封率和载药率; 进一步观察 HD@P-NPs 在低强度聚焦超声(LIFU)辐照下的二维超声及超声造影成像效果; 溶血实验检测 HD@P-NPs 在不同浓度下的溶血率。取对数生长期的瘢痕疙瘩 KFs 按照不同实验条件培养, 并分为 5 组: 对照组(不予特殊处理)、LIFU 辐照组、D@P-NPs 组(仅加入阿霉素)、HD@P-NPs 组、HD@P-NPs+LIFU 辐照组, 使用 MTT 法检测各组细胞存活率; Calcein AM/PI 染色观察各组细胞活性; 细胞迁移实验检测各组细胞迁移率; 活性氧荧光染色观察各组活性氧产生情况, 获取其荧光强度。**结果** 成功制备 HD@P-NPs, 呈球形且大小均一, 平均粒径 $(170.36 \pm 6.03) \text{ nm}$, 平均 Zeta 电位 $(-36.91 \pm 3.56) \text{ mV}$; 血卟啉单甲醚包封率和载药率分别为 67.41%、5.18%, 阿霉素包封率和载药率分别为 72.80%、11.20%。LIFU 辐照后, HD@P-NPs 相变产生微气泡, 在 3 W/cm^2 、2 min 辐照条件下可实现最佳成像效果, 后续实验采用此辐照条件。HD@P-NPs 在 25、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下的溶血率分别为 $(2.48 \pm 0.02)\%$ 、 $(4.87 \pm 0.06)\%$ 、 $(5.03 \pm 0.03)\%$ 、 $(6.10 \pm 0.04)\%$ 。对照组、LIFU 辐照组、D@P-NPs 组、HD@P-NPs 组及 HD@P-NPs+LIFU 辐照组细胞存活率分别为 100%、 $(96.87 \pm 0.71)\%$ 、 $(77.94 \pm 2.83)\%$ 、 $(77.11 \pm 3.53)\%$ 、 $(49.75 \pm 1.25)\%$, HD@P-NPs+LIFU 辐照组与对照组细胞存活率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。HD@P-NPs+LIFU 辐照组见明显红色荧光及少量绿色荧光。对照组、LIFU 辐照组、D@P-NPs 组、HD@P-NPs 组、HD@P-NPs+LIFU 辐照组的细胞迁移率分别为 $(29.96 \pm 3.20)\%$ 、 $(28.62 \pm 2.56)\%$ 、 $(18.13 \pm 0.89)\%$ 、 $(17.46 \pm 0.20)\%$ 、 $(10.04 \pm 1.62)\%$, 其中 HD@P-NPs+LIFU 辐照组细胞迁移率低于其余各组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。HD@P-NPs+LIFU 辐照组活性氧荧光强度为 22.43 ± 3.10 , 与其余各组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 本实验成功制备了 HD@P-NPs, 其在 LIFU 辐照下可提高靶区有效药物浓度, 具有较好的体外超声成像效果, 可实现超声可视化瘢痕疙瘩 KFs 级联放大治疗。

关键词 纳米探针; 瘢痕疙瘩成纤维细胞; 血卟啉单甲醚; 阿霉素; 声动力治疗

[中图分类号] R445.1

[文献标识码] A

Cascade therapy of keloid fibroblasts with acoustic induced phase-change nanoprobes: an experimental study

FAN Zhengchao, XIA Jizhu, ZHU Weiwei, XU Ying, ZHAO Xiangzhi

Department of Ultrasound Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan 646000, China

ABSTRACT **Objective** To prepare a new type of lipid nanoprobes (HD@P-NPs), and to investigate the effects of ultrasound imaging in vitro, migration inhibition as well as amplification therapy on keloid fibroblasts (KFs). **Methods** HD@P-NPs were prepared through ultrasonic emulsification with perfluoroethane as the core lipid shell and loading of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) and doxorubicin (DOX). The morphology, structure, particle size and Zeta potential of HD@P-NPs were measured, and the encapsulation efficiency and loading rate of corresponding drug were calculated. The imaging effects of two-dimensional ultrasound and contrast-enhanced ultrasound (CEUS) under the irradiation of low intensity focused ultrasound (LIFU) were explored. The hemolysis rate of HD@P-NPs at different concentrations were calculated. KFs in the logarithmic

基金项目: 泸州市指导性科技计划项目(22YYJC0037、2022YJY108); 西南医科大学附属医院博士启动资金项目(20123)

作者单位: 646000 四川省泸州市, 西南医科大学附属医院超声医学科

通讯作者: 赵香芝, Email: 466170434@qq.com

growth phase were cultured under different experimental conditions and divided into the following 5 groups: control group (no treatment), LIFU group, D@P-NPs group, HD@P-NPs group and HD@P-NPs+LIFU group. The cell survival rate was detected by MTT assay, the cell activity in each group was observed by Calcein-AM/PI staining method. Cell migration rate in each group was detected by cell migration experiment. Reactive oxygen species fluorescence staining was applied to observe the intracellular reactive oxygen species (ROS) production, and the fluorescence intensity was obtained. **Results** HD@P-NPs were successfully prepared with uniform dimensions. The average particle size was (170.36 ± 6.03) nm, the average Zeta potential was (-36.91 ± 3.56) mV, respectively. The encapsulation efficiency and loading rate of HMME and DOX were 67.41%, 5.18% and 72.80%, 11.20%, respectively. Microbubbles were generated by the phase transition of HD@P-NPs after LIFU irradiation. The optimal imaging efficacy was achieved under the irradiation conditions of 3 W/cm^2 for 2 min and these parameters were subsequently adopted for further experiments. The hemolysis rate of HD@P-NPs at different concentrations (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) were $(2.48 \pm 0.02)\%$, $(4.87 \pm 0.06)\%$, $(5.03 \pm 0.03)\%$, $(6.10 \pm 0.04)\%$, respectively. Cell survival rate in the control, LIFU, D@P-NPs, HD@P-NPs, and HD@P-NPs+LIFU groups were 100%, $(96.87 \pm 0.71)\%$, $(77.94 \pm 2.83)\%$, $(77.11 \pm 3.53)\%$, $(49.75 \pm 1.25)\%$, respectively. A statistically significant difference was observed between the HD@P-NPs+LIFU group and the control group ($P < 0.05$). There was obvious red fluorescence while minimal green fluorescence in the HD@P-NPs+LIFU group. The migration rate in the control, LIFU, D@P-NPs, HD@P-NPs, and HD@P-NPs+LIFU groups were $(29.96 \pm 3.20)\%$, $(28.62 \pm 2.56)\%$, $(18.13 \pm 0.89)\%$, $(17.46 \pm 0.20)\%$, $(10.04 \pm 1.62)\%$, respectively. The migration rate in the HD@P-NPs+LIFU group was significantly lower than that in other groups (all $P < 0.05$). The ROS in the HD@P-NPs+LIFU group was 22.43 ± 3.10 , the difference was statistically significant compared with other groups (all $P < 0.05$). **Conclusion** The HD@P-NPs were successfully prepared in this experiment. These nanoprobes can increase the effective drug concentration in the target area and realize cascade amplification therapy of KFs under LIFU irradiation and ultrasound visualization.

KEY WORDS Nanoprobes; Keloid fibroblasts; Hematoporphyrin monomethyl ether; Doxorubicin; Sonodynamic therapy

瘢痕疙瘩是一种异常纤维增生性疾病,临床常表现为类癌行为^[1],因此也被称为“无法愈合的纤维化伤口”^[2],严重影响组织生理功能,对患者造成一定的心理及经济负担。瘢痕疙瘩诱发因素较多,发病机制复杂,传统手术治疗效果欠佳^[3]。血卟啉单甲醚(HMME)作为声动力治疗(sonodynamic therapy, SDT)的新兴药物,具有性质稳定、暗毒性低及声学激发吸收强等优势^[4-5];阿霉素(DOX)为蒽环类拓扑异构酶抑制剂,能够通过多种机制影响瘢痕疙瘩的关键细胞——成纤维细胞(KFs)^[6],参与了胶原蛋白的异常合成^[7],依托脂质材料独特磷脂双分子层构造,可同时包载疏水性和亲水性药物,实现药物的持续稳定释放,同时声敏激活 HMME 达到 SDT 协同 DOX 增效治疗的目的。在低强度聚焦超声(low intensity focused ultrasound, LIFU)辐照引起的声滴汽化效应下,纳米相变能实现组织的实时可视化,同时靶向破坏微泡技术为精准治疗提供支持^[8],真正实现诊疗一体化。本实验通过制备脂质载药纳米探针 HD@P-NPs,探讨其体外超声成像效果及 SDT 联合药物治疗瘢痕疙瘩 KFs 的疗效,旨在为临床治疗瘢痕疙瘩及 KFs 相关疾病的递药方式提供依据。

材料与方法

一、主要实验试剂及动物

全氟己烷(PFH)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;HMME 和 DOX 均购自上海麦克林生化科技股份有限公司;二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰基甘油(DSPG)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-c-RGD(DSPE-PEG2000-c-RGD)及胆固醇(CHOL)均购自西安瑞禧生物科技有限公司;胰酶细胞消化液(0.25% 胰蛋白酶)、DCFH-DA 活性氧检测试剂盒、DAPI、DiD 均购自上海碧云天生物技术公司;Calcein-AM/PI 双染试剂盒、琼脂粉均购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清、DMEM 培养基均购自泸州欣科盛生物科技有限公司;BALB/C 小鼠购自重庆腾辉比尔实验动物销售有限公司;瘢痕疙瘩 KFs 购自广州铭安生物科技有限公司;人脐静脉内皮细胞(HUVECs)由西南医科大学肿瘤生物实验室提供。

二、主要实验仪器

马尔文激光粒度-电位分析仪(90 Plus Zeta, 美国布鲁克海文仪器公司);透射电子显微镜(Talos F200X, 美国 FEI 公司);倒置荧光显微镜(IX73, 日本 Olympus 公司);光学显微镜(CKX53, 日本 Olympus 公司);紫外分光光度计(UV-5800PC, 上海元析仪器有限公司);超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技有限公司);全自动多功能酶标仪(广州伯齐科技有限公司);移液器及高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);旋转蒸发仪

(瑞士 Buchi 有限公司);LIFU 治疗仪(重庆医科大学超声分子影像学研究所)。

三、主要实验方法

1. 纳米粒的制备:将 DPPC、DSPG、DSPE-PEG2000-c-RGD、CHOL 和 HMME 按质量比 5:2:1.5:1.5:1 的比例共称取 11 mg,溶解于 10 ml 甲醇(CH_3OH)+10 ml 三氯甲烷(CH_2Cl_2)混合有机溶剂中,置于 37℃ 恒温水浴锅内摇晃 10 min,然后将盛有 50 ml 混合有机溶液的圆底烧瓶安装在旋转蒸发仪上,设置水浴温度为 50℃,旋转蒸发后形成一均匀褐色薄膜结构,加入 4 ml 去离子水并在超声洗涤器内震荡洗脱薄膜,最终形成均质半透明褐色水乳剂,避光移至 10 ml EP 管内,加入 200 μl DOX (10 mg/ml) 及 120 μl PFH,冰浴条件下进行超声乳化(声震条件:120 W,时间:4 min),再于高速冷冻离心机内离心(转速:8000 r/min,时间:6 min,温度:4℃),弃上清液,加超纯水重悬沉淀,反复 3 次得到红色乳剂,即为 HD@P-NPs。称量过程中不加 HMME,仅加入 DOX 即制得 D@P-NPs,仅加入 DiD 即制得 DiD 标记的脂质纳米粒,不加任何药物即制得空白脂质纳米粒。

2. HD@P-NPs 的表征检测:将制备好的 HD@P-NPs 进行稀释,取稀释后的纳米悬液上样(保证每个视野内纳米粒数量不超过 5 个),于透射电子显微镜下观察 HD@P-NPs 的形态、结构。取 40 μl HD@P-NPs,并用去离子水稀释 50 倍后转入干净的比色皿内,然后置于马尔文激光粒度-电位分析仪检测 HD@P-NPs 的粒径、分散指数及 Zeta 电位。将 HD@P-NPs 重悬于含 10% 胎牛血清的培养基中,4℃ 冰箱内避光储存,连续 1 周取纳米悬液检测其粒径及分散指数,根据粒径变化评价纳米粒的生物稳定性。

3. 包封率和载药率的检测:将 1 mg HMME 溶解于 CH_3OH ,配置成浓度为 0~15.625 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液,分析其在 400 nm 处的吸光度(OD)值,并绘制 HMME 浓度与 OD 值的标准曲线。另配置浓度为 0~31.250 $\mu\text{g/ml}$ 的 DOX 溶液,分析其在 480 nm 处的 OD 值,并绘制 DOX 浓度与 OD 值的标准曲线。然后取 1 ml HD@P-NPs 纳米悬液置于 CH_3OH 中稀释,直到纳米粒中药物 OD 值在标准曲线范围内,根据标准曲线计算 HMME 和 DOX 的包封率和载药率。

4. 声致相变及体外超声成像效果观察:于 LIFU 辐照后应用光学显微镜观察 HD@P-NPs 的相变情况。将浓度为 1.0 mg/ml 的 HD@P-NPs 纳米悬液加入到琼脂糖凝胶模型中,于不同 LIFU 辐照条件下(声强:1~3 W/cm²,

时间:0~3 min,脉冲模式)观察二维超声和超声造影成像效果,确定最佳辐照条件;使用 ImageJ 软件定量分析信号强度。

5. 溶血实验检测溶血率:取健康 BALB/C 小鼠全血,收集于 EDTA 抗凝管中,轻轻混匀后置于高速冷冻离心机内离心(转速:3000 r/min,时间:20 min);将不同浓度纳米悬液(25、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$)、超纯水、PBS 溶液各取 1 ml 与 30 μl 血细胞混合,在 37℃ 恒温水浴锅内孵育 4 h,离心 10 min,将样品置于同一水平线,并对溶血现象进行拍照,用移液器吸取上清液,使用紫外分光光度计检测其在 542 nm 处的 OD 值,并计算溶血率,公式为:溶血率=(样本组 OD 值-PBS 组 OD 值)/(超纯水组 OD 值-PBS 组 OD 值)×100%。

6. 细胞摄取实验:将 KFs 及 HUVECs 于 6 孔板中培养 24 h,用 DiD 标记的脂质纳米粒与 KFs 或 HUVECs 分别在 37℃ 孵育 1 h、3 h、4 h,然后用 PBS 溶液洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,再用 PBS 溶液洗涤 3 次,每孔加入 0.5 ml DAPI 染色 5 min,轻轻晃动 6 孔板以保证染色均匀,最后于倒置荧光显微镜下观察细胞对 HD@P-NPs 的摄取情况。

7. 细胞毒性实验:当 KFs 处于对数生长期且细胞生长至 80%~90% 时,用新鲜 DMEM 完全培养基调整细胞悬液浓度为 1×10^5 个/ml,取 0.1 ml 并将细胞接种于 96 孔板中(每孔 1×10^4 个,均匀分布),置于培养孵箱中继续培养 24 h 直至细胞完全贴壁,然后吸去培养基中旧液,分别加入浓度为 500、250、125、62.5、31.25、15.625 $\mu\text{g/ml}$ 的空白脂质纳米悬液共培养 24 h,使用 MTT 法检测细胞存活率,分析纳米粒细胞毒性。

8. 分组及相关检测

(1) 分组:取对数生长期的 KFs 按照不同实验条件分为对照组(未进行任何处理)、LIFU 辐照组(仅进行超声辐照)、D@P-NPs 组(加入 D@P-NPs 纳米悬液)、HD@P-NPs 组(加入 HD@P-NPs 纳米悬液)及 HD@P-NPs+LIFU 辐照组(加入 HD@P-NPs 纳米悬液并进行超声辐照),于 37℃、5% CO_2 条件下孵育 24 h,其中 LIFU 辐照组和 HD@P-NPs+LIFU 辐照组于孵育 4 h 后进行超声辐照继续培养 24 h;细胞存活率和细胞活性检测时细胞密度为每孔 1×10^5 个;细胞迁移情况检测时细胞密度为每孔 2.0×10^5 个;活性氧产生情况检测时细胞密度为每孔 1×10^4 个。

(2) MTT 法检测细胞存活率:各组均避光加入 20 μl MTT 溶液,孵育 4 h 后吸出混合液并加入 150 μl DMSO 溶液,使用酶标仪检测 490 nm 波长下的 OD 值,计算细

胞存活率。

(3) Calcein AM/PI 染色观察细胞活性: 各组均加入配置好的 Calcein-AM/PI 溶液继续孵育 20 min, 然后用 PBS 溶液洗去未结合的染料, 于荧光显微镜下观察细胞活性。

(4) 细胞迁移实验检测细胞迁移率: 各组均加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 2.0 ml, 待细胞培养至 80%~90% 融合后用无菌吸管尖端刮去培养中心, 并用 PBS 溶液洗去划痕区域受损细胞, 于光学显微镜下观察 0 h、24 h 细胞迁移情况; 使用 ImageJ 软件观察不同时间点细胞划痕面积, 计算细胞迁移率, 公式为: 细胞迁移率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 × 100%。

(5) 活性氧荧光染色观察活性氧产生情况: 各组均吸出旧培养基并用 PBS 溶液洗涤 3 次, 立即加入配置好的 DCFH-DA 溶液孵育 20 min, 再次使用 PBS 溶液避光冲洗, 于倒置荧光显微镜下观察活性氧产生情况; 使用 ImageJ 软件定量分析各组活性氧荧光强度。

四、统计学处理

应用 GraphPad Prism 10.1 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两组比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、HD@P-NPs 的表征

HD@P-NPs 呈棕红色, 透射电子显微镜下形态呈球形, 大小均一 (图 1), 分散性好, 平均粒径 (170.36 ± 6.03) nm, 平均 Zeta 电位 (-36.91 ± 3.56) mV。于含 10% 胎牛血清的培养基中存放 1 周后, HD@P-NPs 粒径无明显改变, 稳定在 170 nm, 分散指数为 0.2 (图 2), 具有良好的生物稳定性。

二、HD@P-NPs 的药物包封率和载药率

紫外吸收光谱显示, HMME 在 400 nm 处出现吸收波峰, DOX 在 480 nm 处出现吸收波峰, HD@P-NPs 在 400 nm 和 480 nm 均出现吸收波峰 (图 3)。当 HMME 与 DOX 质量比为 1:2 时, HD@P-NPs 具有相对较高的药物包封率和载药率, 对应条件下 HMME 包封率和载药率分别为 67.41%、5.18%, DOX 包封率和载药率分别为 72.80%、11.20%。

三、HD@P-NPs 体外超声成像效果及声致相变性能

当声强为 1 W/cm² 时, HD@P-NPs 在二维超声下不同辐照时间的信号强度比较差异无统计学意义, 超声造影下辐照 3 min 的信号强度较辐照 1 min 及 2 min 时增

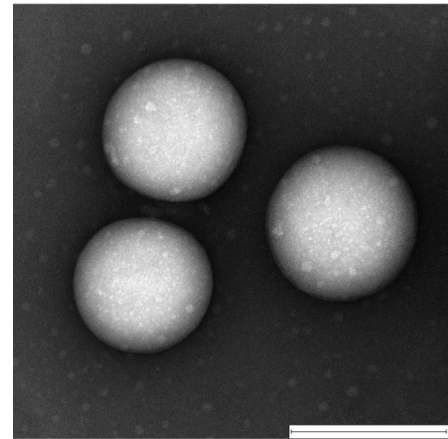


图 1 HD@P-NPs 透射电子显微镜下观 (标尺 200 nm)

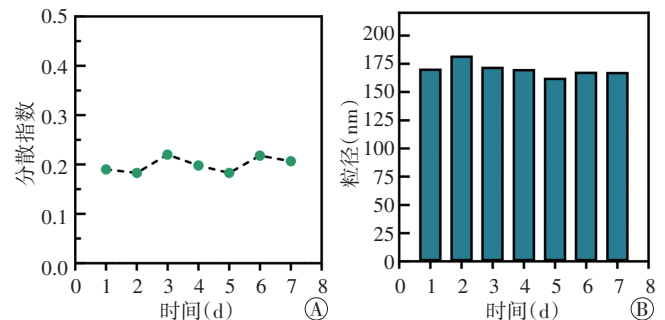


图 2 HD@P-NPs 分散指数 (A) 及粒径 (B) 变化

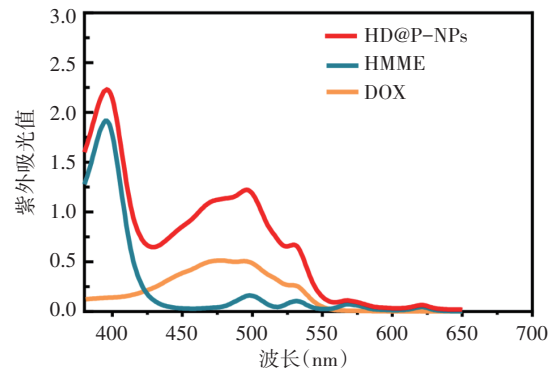


图 3 HMME、DOX、HD@P-NPs 的紫外吸收光谱图

加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 当声强为 2 W/cm² 时, 随着辐照时间的增加, HD@P-NPs 信号强度逐渐增加, 二维超声下辐照时间为 2 min 及 3 min 时信号强度比较差异无统计学意义, 超声造影下辐照 3 min 的信号强度较辐照 1 min 及 2 min 时增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 当声强为 3 W/cm², 辐照时间为 1 min 和 2 min 时, HD@P-NPs 在二维超声和超声造影下信号骤增, 但在辐照 3 min 时信号有所减弱, 辐照 2 min 时信号强度与其余各时间点比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见图 4 和表 1。后续实验使用 LIFU 辐照条件为声强 3 W/cm²、时间 2 min。

光学显微镜下观示 LIFU 辐照后 HD@P-NPs 可产生大量的微气泡, 并在声强 3 W/cm²、时间 2 min 的辐

照条件下达微泡最大化。见图 5。

四、溶血实验结果

溶血实验结果显示, HD@P-NPs 在 25、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下的溶血率分别为 $(2.48\pm0.02)\%$ 、 $(4.87\pm0.06)\%$ 、 $(5.03\pm0.03)\%$ 、 $(6.10\pm0.04)\%$ 。

五、细胞摄取结果

孵育 1 h 后 KFs 及 HUVECs 内均未见明显红色荧光信号; 孵育 3 h 后 KFs 内红色荧光信号有所增加, HUVECs 内未见明显红色荧光信号; 孵育 4 h 后 KFs 内

见大量红色荧光信号, HUVECs 内未见明显红色荧光信号。见图 6。

六、细胞毒性实验结果

空白脂质纳米粒浓度为 500、250、125、62.5、31.25、15.625 $\mu\text{g/ml}$ 时, 细胞存活率分别为 $(86.17\pm2.41)\%$ 、 $(88.00\pm1.39)\%$ 、 $(89.67\pm0.91)\%$ 、 $(90.83\pm0.40)\%$ 、 $(90.80\pm0.30)\%$ 、 $(90.97\pm1.33)\%$, 可排除纳米粒毒性干扰。

七、各组相关检测结果

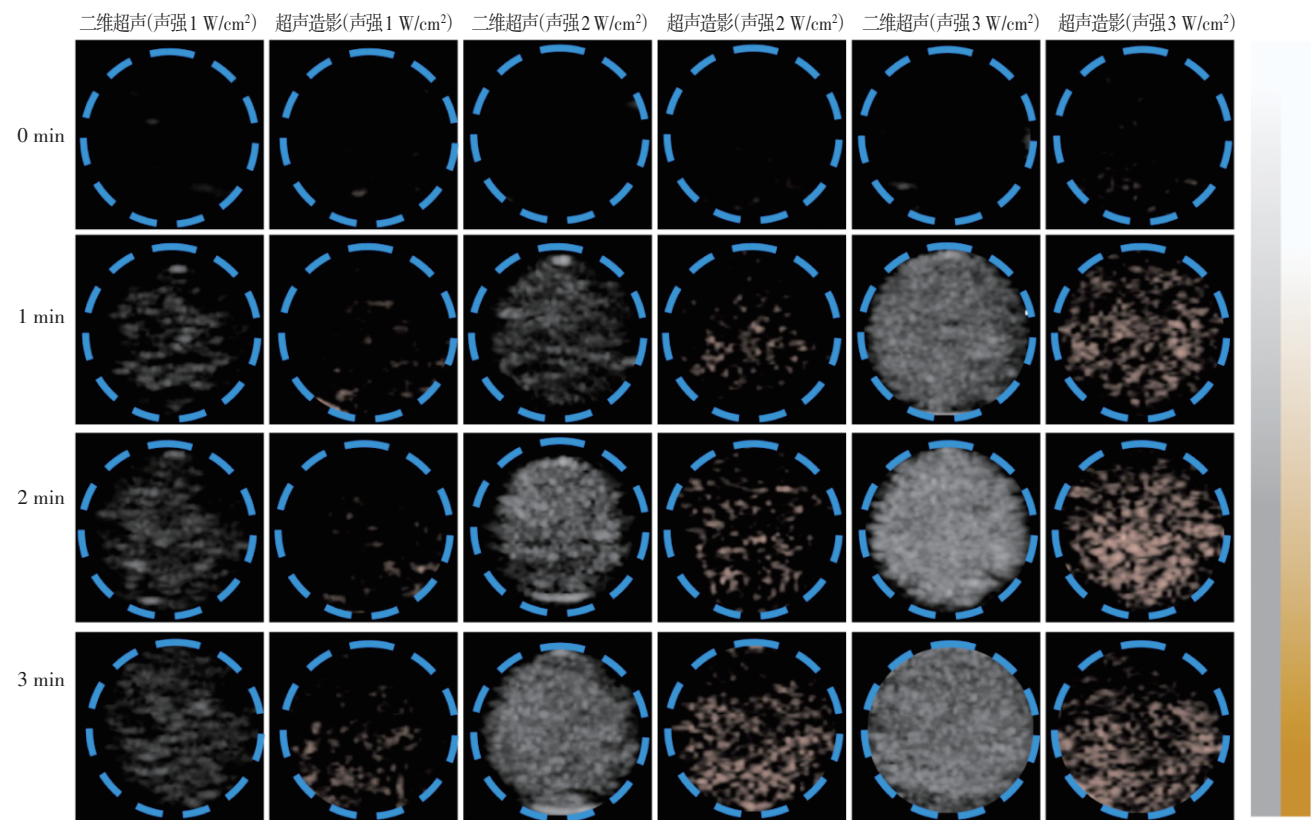


图 4 不同 LIFU 辐照条件下 HD@P-NPs 的二维超声和超声造影图

表 1 不同 LIFU 辐照条件下二维超声和超声造影信号强度变化($\bar{x}\pm s$)

时间	二维超声			超声造影		
	1 W/cm ²	2 W/cm ²	3 W/cm ²	1 W/cm ²	2 W/cm ²	3 W/cm ²
1 min	12.27±0.50	28.70±2.66	60.61±2.20	2.17±0.57	11.27±2.35	29.51±1.59
2 min	19.96±1.09	46.26±2.23	81.42±0.58	2.89±0.98	11.63±1.54	41.51±1.61
3 min	20.74±1.05	59.22±2.13	67.70±1.90	9.31±1.00	31.18±3.01	33.76±2.43

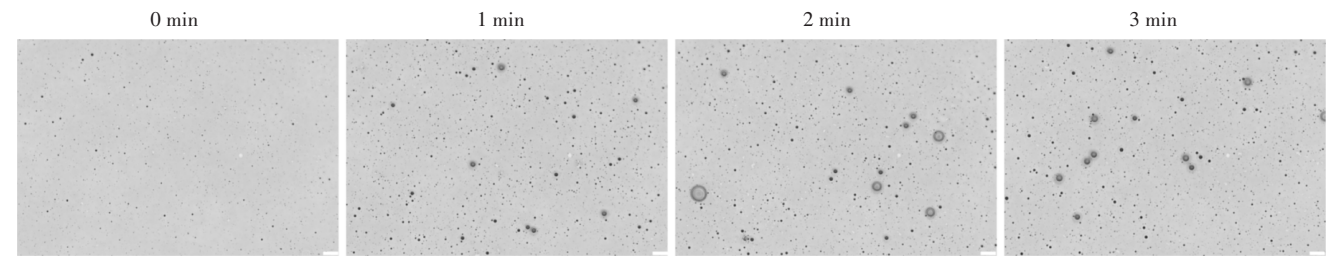


图 5 声强 3 W/cm², 时间 0~3 min 辐照条件下 HD@P-NPs 光学显微镜下观(标尺 50 μm)

(1) 各组细胞存活率比较: 对照组、LIFU 辐照组、D@P-NPs 组、HD@P-NPs 组及 HD@P-NPs+LIFU 辐照组细胞存活率分别为 100%、 $(96.87 \pm 0.71)\%$ 、 $(77.94 \pm 2.83)\%$ 、 $(77.11 \pm 3.53)\%$ 、 $(49.75 \pm 1.25)\%$ ，HD@P-NPs+LIFU 辐照组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

(2) 各组细胞活性检测结果: LIFU 辐照组仅见大量绿色荧光分布，未见红色荧光; D@P-NPs 组和 HD@P-NPs 组均可见部分红色荧光; HD@P-NPs+LIFU 辐照组见明显红色荧光及少量绿色荧光。见图 7。

(3) 各组细胞迁移率比较: 对照组、LIFU 辐照组、

D@P-NPs 组、HD@P-NPs 组、HD@P-NPs+LIFU 辐照组细胞迁移率分别为 $(29.96 \pm 3.20)\%$ 、 $(28.62 \pm 2.56)\%$ 、 $(18.13 \pm 0.89)\%$ 、 $(17.46 \pm 0.20)\%$ 、 $(10.04 \pm 1.62)\%$ ，其中 HD@P-NPs+LIFU 辐照组细胞迁移率低于其余各组，差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见图 8。

(4) 各组活性氧荧光强度比较: D@P-NPs 组、HD@P-NPs 组及 HD@P-NPs+LIFU 辐照组活性氧荧光强度分别为 14.61 ± 1.32 、 15.35 ± 1.95 、 22.43 ± 3.10 ，HD@P-NPs+LIFU 辐照组与其余两组比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 对照组和 LIFU 辐照组均未见活性氧荧光信号。见图 9。

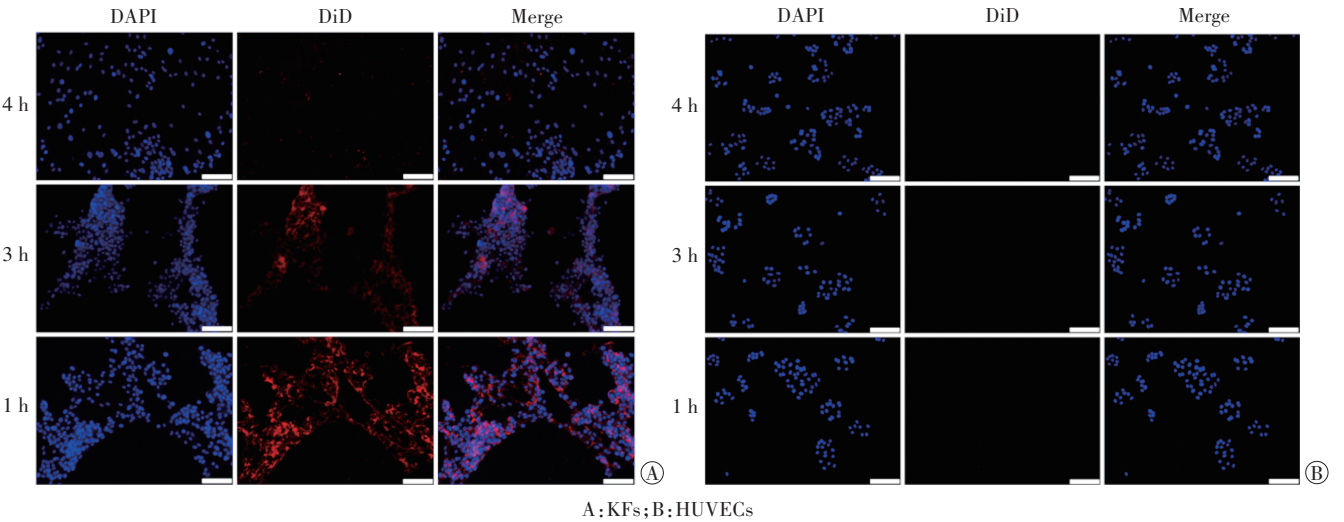


图 6 KFs 及 HUVECs 摄取 HD@P-NPs 倒置荧光显微镜下观 (标尺 200 μm)

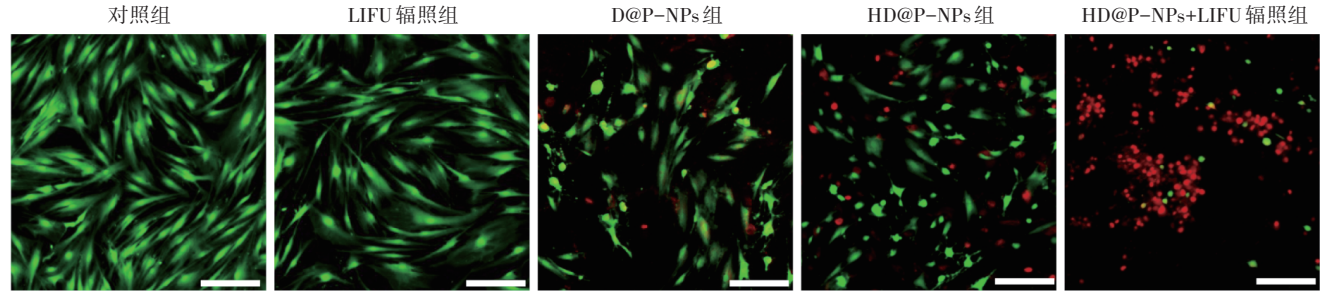


图 7 各组 Calcein AM/PI 染色倒置荧光显微镜下观 (活细胞呈绿色, 死细胞呈红色, 标尺 200 μm)

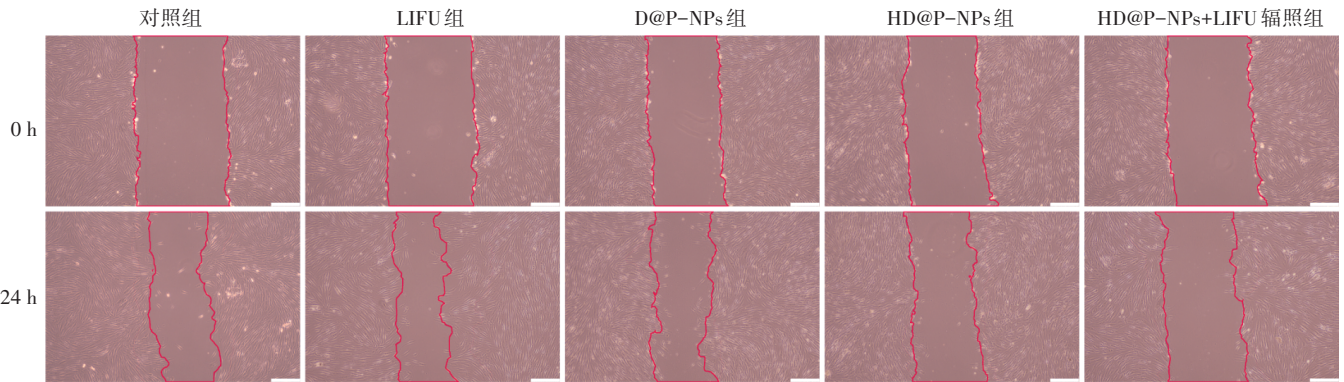


图 8 各组细胞迁移划痕光学显微镜下观 (标尺 500 μm)

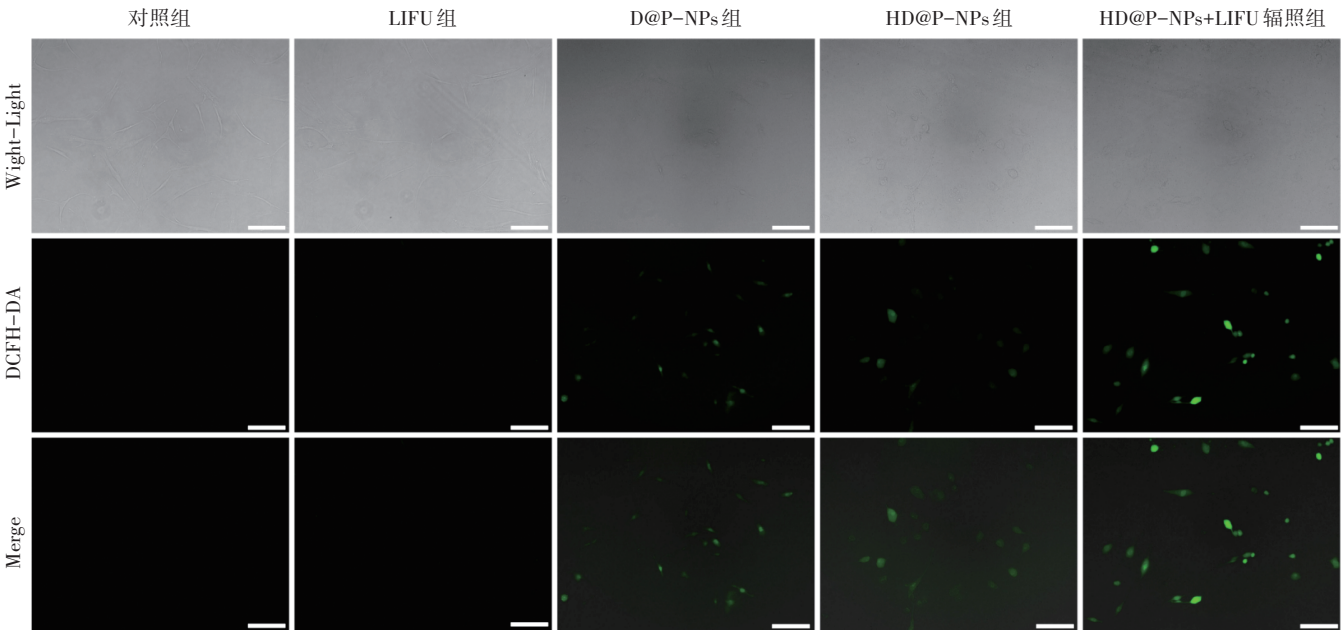


图9 各组活性氧荧光信号倒置荧光显微镜下观(标尺 200 μm)

讨论

瘢痕疙瘩具有 KFs 异常增殖、微血管过表达及细胞外基质异常沉积等特征^[9],传统治疗手段效果不佳,且反复刺激可能诱发瘢痕癌^[10],高复发率更是目前临床治疗面临的主要挑战^[11]。SDT 是一种基于超声技术的新型无创治疗方式,主要通过声敏剂激活产生活性氧来杀伤靶区细胞^[12-13],同时实现特定细胞分子示踪成像并发挥治疗作用,是分子成像技术的研究热点^[14-15]。近年来,SDT 在肿瘤等治疗领域的应用已取得显著进展,尤其在材料科学、药物递送系统和治疗策略方面均有了新的突破^[16]。本实验将超声成像与 SDT 相结合,采用超声乳化法将声敏药物 HMME 和化疗药物 DOX 共同载入脂质载体,核心负载的相变材料 PFH 在 LIFU 辐照下表现出卓越的超声相变性能,可以实现瘢痕靶区的实时成像,通过干扰瘢痕疙瘩 KFs 增殖提高靶区药物疗效,旨在为瘢痕疙瘩及相关 KFs 疾病的治疗提供新思路。

本实验制备的 HD@P-NPs 以 PFH 为内核,PFH 是一种具有良好生物惰性和化学稳定性的氟碳化合物,可在 LIFU 辐照下发生线性震荡从而转化为微气泡^[17],HD@P-NPs 通过与周围组织环境形成声阻抗差异,产生显著的背向散射信号,从而实现靶区结构成像^[18-19]。本实验结果显示,HD@P-NPs 信号强度随着辐照声强及辐照时间的增加而逐渐增强,最终在声强 3 W/cm²、时间 2 min 辐照条件下产生最大的信号强度,但过度辐照会造成一定的信号衰减,当声强 3 W/cm²、辐照 3 min 时信号强度有所减弱,这可能是由于相变微泡聚

合后导致结构不稳定,出现崩塌。本实验结果表明 HD@P-NPs 具有良好的超声成像效果,核心搭载的 PFH 在 LIFU 辐照下通过机械震荡产生声滴汽化效应,实现了结构微泡化,且辐照声强和辐照时间为诱发相变产生的关键因素。低频超声波具有较强的声波穿透力,可以暂时增加细胞间隙和细胞膜通透性,在促进纳米药物渗透的同时又可保护周围正常组织,这种超声结合微泡的主要优势在于药物的释放具有选择性^[20-21]。本实验结果显示 KFs 对 HD@P-NPs 摄取呈明显时间依赖性,孵育 4 h 后 KFs 内红色荧光明显多于 HUVECs,表明 HD@P-NPs 通过脂膜互溶可促进 KFs 内纳米摄取,通过体外 LIFU 辐照可实现 HD@P-NPs 的靶区精准释放,并减少对周围正常组织的损伤。

本实验细胞毒性实验结果显示,不同浓度空白脂质纳米粒下 KFs 存活率均在 90% 左右,可排除纳米毒性干扰,为 SDT 研究提供了有力的支持。进一步将 KFs 按照不同实验条件进行共孵育,结果显示 HD@P-NPs+LIFU 辐照组细胞存活率为 (49.75±1.25)%,与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),分析其机制可能为:靶区裂解释放的 DOX 及 LIFU 协同作用会产生强大的声敏治疗作用,HMME 联合 LIFU 辐照后,HD@P-NPs 的细胞抑制作用明显增强,同时该纳米粒稳定性好,可减少 DOX 不稳定渗漏的发生^[22]。采用脂质纳米粒对 DOX 进行包裹,可减少其对周围组织的作用,并进一步实现深部瘢痕组织的靶向治疗。本实验各组迁移率比较结果显示,HD@P-NPs+LIFU 辐照组细胞迁移率低于其余各组,差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$),表明仅将 HMME 及 DOX 包载于脂质纳米探针

的细胞迁移抑制作用不及 HD@P-NPs+LIFU 辐照组细胞,其机制可能为细胞外胶原沉积所构建的物理屏障对纳米药物的渗透有一定限制,这也是恶性纤维化疾病治疗的一大障碍。空化微泡能够有效调节细胞间质压力,进而提升细胞疗效,LIFU 辐照后细胞膜通透性得到暂时提升,有助于减小向外梯度分布的间质压力,为纳米药物的渗透创造了有利条件^[23],增加了靶区声敏药物的蓄积,因此 HD@P-NPs+LIFU 辐照组细胞表现出明显迁移抑制。大量的活性氧可导致细胞器功能障碍、细胞内氧化还原动态平衡紊乱,并通过内源性线粒体通路诱导细胞凋亡。本实验结果显示,HD@P-NPs+LIFU 辐照组活性氧荧光强度显著高于其余各组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。这是因为除了 DOX 的氧化应激作用,还与 HMME 强大的活性氧产率有关,LIFU 辐照下 HMME 受到激活,从基态转变为激发态,随后与邻近氧分子进行连续化学反应,最终产生丰富的活性氧产物^[24]。同时,LIFU 靶向破坏纳米释放的 DOX 能够提高靶区有效药物浓度,从而实现 SDT 与 DOX 联合作用下的细胞生长抑制,达到药物协同增效治疗的目的。

综上所述,本实验成功制备了一种以 SDT 为基础的新型脂质载药纳米探针 HD@P-NPs,具有较好的相变成像效果,可为瘢痕疙瘩的治疗提供高对比度图像,通过 SDT 与 DOX 的联合靶区释放,加速了 KFs 凋亡,为瘢痕疙瘩及 KFs 相关疾病的监测和治疗提供了理论基础。

参考文献

- [1] Sun W, Liu Y, Zhao L, et al. New progress of tuberculosis scar carcinoma[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2023, 42(3): 653–659.
- [2] Ud-Din S, Bayat A. Keloid scarring or disease; unresolved quasi-neoplastic tendencies in the human skin[J]. *Wound Repair Regen*, 2020, 28(3): 422–426.
- [3] Murakami T, Shigeki S. Pharmacotherapy for keloids and hypertrophic scars[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(9): 4674.
- [4] Huang J, Liu F, Han X, et al. Nanosonosensitizers for highly efficient sonodynamic cancer theranostics[J]. *Theranostics*, 2018, 22(8): 6178–6194.
- [5] Qian C, Zhao G, Huo M, et al. Tumor microenvironment-regulated drug delivery system combined with sonodynamic therapy for the synergistic treatment of breast cancer[J]. *RSC Adv*, 2024, 14(25): 17612–17626.
- [6] 胡恒, 郑江红. iRGD-外泌体-阿霉素抑制成纤维细胞体外增殖的研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2017, 13(2): 70–72, 81.
- [7] 王瑞, 吕涛, 霍晶, 等. 咪喹莫特抑制病理性能纤维细胞迁移及作用靶点的相关机制[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(20): 3173–3177.
- [8] Li M, Zhu Y, Yang C, et al. Acoustic triggered nanobomb for US imaging guided sonodynamic therapy and activating antitumor immunity[J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 2177–2189.
- [9] Yuan B, Upton Z, Leavesley D, et al. Vascular and collagen target: a rational approach to hypertrophic scar management[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2023, 12(1): 38–55.
- [10] Piersma B, Hayward MK, Weaver VM. Fibrosis and cancer: a strained relationship[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(2): 188356.
- [11] 李卫平, 秦涛, 于扬, 等. 复发性耳部瘢痕疙瘩的多模式治疗效果[J]. *中国美容整形外科杂志*, 2024, 35(3): 171–174.
- [12] 蒋恩琰, 王丹, 张照霞, 等. 声动力疗法的机制研究进展[J]. *临床超声医学杂志*, 2023, 25(8): 677–680.
- [13] Li M, Zhang Y, Zhang X, et al. Degradable multifunctional porphyrin-based porous organic polymer nanosonosensitizer for tumor-specific sonodynamic, chemo- and immunotherapy[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(43): 48489–48501.
- [14] Guo J, Pan X, Wang C, et al. Molecular imaging-guided sonodynamic therapy[J]. *Bioconjug Chem*, 2022, 33(6): 993–1010.
- [15] Huang J, Liu F, Han X, et al. Nanosonosensitizers for highly efficient sonodynamic cancer theranostics[J]. *Theranostics*, 2018, 8(22): 6178–6194.
- [16] Son S, Kim JH, Wang X, et al. Multifunctional sonosensitizers in sonodynamic cancer therapy[J]. *Chem Soc Rev*, 2020, 49(11): 3244–3261.
- [17] Zeng Q, Qiao L, Cheng L, et al. Perfluorohexane-loaded polymeric nanovesicles with oxygen supply for enhanced sonodynamic therapy[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(5): 2956–2969.
- [18] 赵佳雯, 张亮, 周颀, 等. 载硫化铈及阿霉素靶向相变型纳米粒多模态显像及联合治疗卵巢癌体外实验[J]. *中国医学影像技术*, 2021, 37(1): 13–18.
- [19] Zhu Yi, Yoon H, Zhao AX, et al. Leveraging the imaging transmit pulse to manipulate phase-change nanodroplets for contrast-enhanced ultrasound[J]. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2019, 66(4): 692–700.
- [20] Cui X, Zhu J, Wu X, et al. Hematoporphyrin monomethyl ether-mediated photodynamic therapy inhibits the growth of keloid graft by promoting fibroblast apoptosis and reducing vessel formation[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2020, 19(1): 114–125.
- [21] Zhao H, Wu M, Zhu L, et al. Cell-penetrating peptide-modified targeted drug-loaded phase-transformation lipid nanoparticles combined with low-intensity focused ultrasound for precision theranostics against hepatocellular carcinoma[J]. *Theranostics*, 2018, 8(7): 1892–1910.
- [22] Kim M, Kim D, Jang Y, et al. Development of a polymersome-based nanomedicine for chemotherapeutic and sonodynamic combination therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1194.
- [23] Zhong YX, Liao JC, Liu X, et al. Low intensity focused ultrasound: a new prospect for the treatment of Parkinson's disease[J]. *Ann Med*, 2023, 55(2): 2251145.
- [24] Yin H, Sun L, Pu Y, et al. Ultrasound-controlled CRISPR/Cas9 system augments sonodynamic therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *ACS Cent Sci*, 2021, 7(12): 2049–2062.

(收稿日期: 2024-04-09)